

VERSUCHE ÜBER EINE ANTIBAKTERIELLE,
DESODORIERENDE UND VIRUSAKTIVE WIRKUNG
VON DREI NEUEN VERBINDUNGEN

von
PETER FIX

1961

Aus dem Hygiene-Institut der
Johannes Gutenberg-Universität zu Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

VERSUCHE ÜBER EINE ANTIBAKTERIELLE,
DESODORIERENDE UND VIRUSAKTIVE WIRKUNG
VON DREI NEUEN VERBINDUNGEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

PETER FIX
aus Bünde/Westf.



MAINZ 1961

Dekan: Prof. Dr. Dr. Lang
Referent: Prof. Dr. Dr. Gillissen
Korreferent: Prof. Dr. Kliewe
Tag der mündlichen Prüfung: 20. November 1961



GESAMTHERSTELLUNG:

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64 - 66

INHALSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung und Ziel der Arbeit	1
II. Allgemeine Gesichtspunkte der Virusdesinfektion	2
III. Hygienische Gesichtspunkte der Zellstoffimprägnation mit bactericiden und desodorierenden Stoffen	12
Eigene Versuche	
IV. Die antibakterielle Wirkung der Testsubstanzen	13
1. Versuchsanordnung	13
2. Ergebnisse	22
V. Die desodorierende Wirkung der Testsubstanzen	23
1. Versuchsanordnung	23
2. Ergebnisse	30
VI. Die virusaktive Wirkung der Testsubstanzen.	31
1. Allgemeine Versuchsanordnung	31
2. Ergebnisse	55
VII. Zusammenfassung	59
VIII. Literaturverzeichnis	61

I. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Viele hygienische Probleme bei der Herstellung und Verwendung von Zellstoff für Monatsbinden der Frau können als befriedigend angesehen werden. Es gibt jedoch noch einige Dinge, die verbessert werden könnten. Als vorteilhaft könnte die Imprägnierung mit desodorierenden Stoffen angesehen werden. Es wäre also daran zu denken, Stoffe zu verwenden, die entweder die durch den bakteriellen Eiweissabbau entstehenden Geruchsstoffe binden oder die Entstehung dieser Geruchsfaktoren verhindern. Letzteres ist sowohl denkbar über eine antibakterielle Wirkung, das heißt einen bakteriostatischen oder baktericiden Effekt, als auch über eine Blockierung bestimmter Fermentprozesse. Natürlich dürfen solche Substanzen auf die Schleimhaut keinen Reiz ausüben und - eine sehr schwer zu erfüllende Forderung - das Gleichgewicht der normalen Keimbesiedlung nicht stören. -

Eine weitere Frage ist die, ob es Substanzen gibt, die eine virucide Wirkung haben und die doch keinen schädlichen Einfluß auf den Biotop besitzen. Es sollte deswegen untersucht werden, ob verschiedene Metallverbindungen des Acetyl-Acetons (Cu-, Al-, Mg-Salze^x) eine antibakterielle Wirkung besitzen, wobei im idealen Falle ein antibakterielles Spektrum aufgestellt werden sollte. Ferner wurde untersucht, ob diese Substanzen unter entsprechenden Versuchsbedingungen unabhängig von einer unter Umständen vorhandenen antibakteriellen Wirkung einen desodorierenden Effekt haben. Darüber hinaus interessierte, ob diese Substanzen virusaktiv sind. Bei diesen Versuchen wurden mehrere Virusarten verwandt.

(x) Freundlicherweise überlassen von den Vereinigten Papierwerken, Nürnberg.

II. ALLGEMEINE GESICHTSPUNKTE DER VIRUSDESINFEKTION

Die Virusdesinfektion hat in den letzten Jahren eine große Bedeutung erlangt. Da die verschiedenen Virusarten ähnlich wie die verschiedenen Bakterienarten eine unterschiedliche Resistenz gegen die einzelnen Desinfektionsmittel besitzen, muß eben rein empirisch festgestellt werden, welche Substanzen oder Substanzgruppen gegen jede Virusart am wirkungsvollsten sind. -

Von den physikalischen Möglichkeiten der Virusabtötung ist besonders die Einwirkung erhöhter Temperaturen zu nennen; dazu ist zu bemerken, daß die Thermoresistenz gleicher Viren bei Anwendung von feuchter oder trockener Hitze unterschiedlich ist (Gönnert und Bock, Tab.1 und 2). Im Gegensatz zu Bakterien bleiben Viren in flüssigem Milieu bei Temperaturen von 20 - 32°C nur kurze Zeit aktiv (Bingel); sie sind um so temperaturanfälliger, je weniger sie gereinigt sind, je mehr also organische Substanz beigemischt ist. Daraus ergibt sich, daß man eine schnelle Desinfektion bei Temperaturen zwischen 50 und 100°C (feuchte Hitze!) erwarten kann. Die Einwirkzeiten sind umgekehrt proportional den Temperaturen, je kürzer die Zeiten, desto größer die Temperaturen (Tab.3). Allerdings reagieren Viren verschiedener Stämme unterschiedlich.

Allgemein kann gesagt werden, daß durch Kochen das Virus fast augenblicklich (n. Zinsser, zit.n. Salchow (1952), n. Freytag (1952) und n. Boyce (1952)), spätestens in 15 Minuten inaktiviert wird (n. Henk und Stokes, zit. n. Hahn (1955)). Höhere Temperaturen und längere Einwirkungszeiten werden aus klinischen Erfahrungen heraus empfohlen. -

Viren sind trockener Hitze gegenüber weniger empfindlich; dieses findet bei Bakterien seine Parallele. So wurden vegetative Bakterien (Sg 511), die ihren Absterbepunkt bei 58°C in feuchtem Milieu in 10 Minuten hatten, bei trockener Hitze erst bei 135°C inaktiv (Bingel, Holmes (1954)). Daraus ergibt sich, daß Temperatur und Einwirkungszeit größer sein müssen als bei feuchter Hitze (Tab.1 und 2). Mc Callum (1955) empfiehlt z.B. bei der Hepatitisdesinfektion 160°C bei 60 Minuten Einwirkungszeit, um eine völlige Desinfektion zu erreichen. -

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei Verwendung von höheren Temperaturen (feuchte und trockene Hitze) zur Virusdesinfektion die Höhe der Temperatur, die Einwirkungszeit, die Thermoresistenz des einzelnen Virusstammes und das Suspensionsmedium ausschlaggebend sind. -

Zu den physikalischen Möglichkeiten einer Virusabtötung gehört auch die Be-

strahlung mit sehr kurzwelligen Strahlen, z. B. Radium- und Röntgenstrahlen. Grundsätzlich ist aber zu sagen, daß nur mit sehr hohen Dosen, d. h. mit mehreren 100 000 r eine Virusabtötung erreicht werden kann, während mit kleineren Dosen nur die Virulenz verringert wird (zitiert nach Bingel).

Mit U. V. -Strahlen erzielte man recht gute Erfolge bei Viren aller Größenordnungen. Das Gebiet der optimalen Wellenlänge liegt bei 2650 Å (n. Hollaender u. Oliphant (1944), Tamm u. Fluke (1950)) bei Grippe und Vaccinevirus (n. Fluke (1951), Wahl u. Latarget (1947)) bei Phagen und (n. Leyon (1951) bei Poliomyelitisviren. Wichtig für Erfolg und Misserfolg der U. V. Behandlung der Viren ist die Zusammensetzung des Suspensionsmediums. Ähnlich wie bei der Beeinflussung von Bakterien durch U. V. Licht sollen eiweißreiche Medien auch Viren schützen (Tab. 4). - Bei der chemischen Virusdesinfektion spielen außer den oben genannten Faktoren auch noch andere Dinge eine Rolle, die experimentell berücksichtigt werden müssen. Die einzelnen Virusstämme benötigen ganz bestimmte pH-Bereiche, außerhalb derer es zu einer Inaktivierung der Viren kommt. Stark basische oder saure Substanzen können deswegen allein durch die Veränderung des pH-Wertes eine wirkliche Desinfektion vortäuschen. Weiter ist daran zu denken, daß manche Stoffe in den zu prüfenden Konzentrationen cytotoxisch wirken, so daß eine bei geringeren Konzentrationen u. U. vorhandene virucide Wirkung übersehen werden kann. Zu berücksichtigen ist ferner, daß pathogene Viren in der Natur meist durch eiweißreiches Material in einem gewissen Grade geschützt sind, so daß diese sich in ihrer Ansprechbarkeit auf chemische Stoffe oft erheblich von gereinigten Virenpräparaten unterscheiden (Gönnert u. Sykes). Als allgemeine Erfahrung kann gelten, daß gute antibakterielle Desinfektionsmittel gegen Viren einen erheblich schlechteren Effekt haben (Albrecht 1959). - In der Literatur sind zahlreiche Untersuchungen mit den verschiedensten Stoffen beschrieben worden. Besonders interessieren Formalin, Phenol und Chlor; ihre Wirkung auf verschiedene Virusarten ist in Tab. 5 bis 7 zusammengefaßt. -

Aus Tab. 5 geht hervor, daß Formalin in Verdünnungen von etwa 0,10 % bis 2 % auf Viren aller Größenordnungen eine gute desinfizierende Wirkung besitzt; die Unterschiede in den Versuchsergebnissen verschiedener Autoren ergeben sich bei gleicher Technik durch die Wahl der Medien (Serum, Bouillon usw. Eiweißschutz s. o.). Es ist auch nicht gleichgültig, ob Formalin auf konzentrierte Organ-Virususpensionen oder auf eine zur Infektion vorbereitete verdünnte Suspension einwirkt; endlich ist die Wirkung unterschiedlich, wenn man Formalin an verschiedenen infizierten Versuchsobjekten

(Embryo, Versuchstier, Gewebekultur) austestet. -

Die Versuche mit Phenol (Tab.6) ergeben zum Teil widersprechende Resultate. Verschiedene Autoren erhielten mit denselben Viren unter gleichen Versuchsbedingungen oft ganz unterschiedliche Versuchsergebnisse. Dennoch gewinnt man den Eindruck, daß die größeren organisierten Viren besser und schneller reagieren als die kleinen. Eine Ausnahmestellung bilden die Louping-ill-Viren (15-20 m μ); letztere können sogar durch Phenol länger infektionstüchtig gehalten werden. -

Chlor kann grundsätzlich als viruswirksam angesehen werden (Tab.7); allerdings variieren die benötigten Konzentrationen und Einwirkzeiten sehr. Erste-re liegen zwischen 0,05 mg/l bei Phagen und 200 00 mg/l aktiven Anfangs-chlor bei der Virusschweinepest, im letzten Fall wurden Einwirkzeiten von 30 Minuten bis zu mehreren Stunden festgestellt. Die Verschiedenheit der Dosen und Einwirkzeiten erklärt sich aus der Verwendungsabsicht entweder zur Desinfektion infizierter Organismen mit großen Mengen Chlorkalk oder zur Desinfektion von Trinkwasser mit starker Bildung von HOCl. Weiter ist es verständlich, daß in lebenden Zellen vorhandenes Virus weniger empfindlich gegen Chlor ist als freies. Die Konzentration muß also umso größer sein, je stärker die Beimengungen organischer Substanzen sind (Bingel). Auf Grund seiner guten Viruswirksamkeit wird Chlor als Substitut verschiedener anderer Verbindungen, besonders der halogenisierten Phenole benutzt, um die Wirkung zu erhöhen.

Weiter prüfte man eine Vielzahl von Verbindungen und Substanzen, z.B. Oxydationsmittel, reduzierende Reagenzien, Säuren, Basen, Halogene, zusammengesetzte organische Stoffe usw. Dabei entdeckte man eine Reihe von Substanzen, mit denen sich das eine oder andere Virus inaktivieren ließ. Jedoch mit Ausnahme von Formalin, Kaliumpermanganat und freiem Jod konnte keine Substanz gefunden werden, deren Wirkung sich auch auf die kleinsten Virusarten erstreckt und damit die Bedingung erfüllt, die an ein universelles Virusdesinfektionsmittel gestellt werden muß (Gönnert u. Bock). -

Zieht man die Schlußfolgerung, so gibt es heute schon viele Substanzen und Stoffgruppen, die Viren in vitro zerstören können. Die Reichweite dieser Mittel hängt aber vom Typ des Stammes bzw. des einzelnen Virus und den Bedingungen der Anwendung ab, so daß die Möglichkeiten für eine universelle Virusdesinfektion noch immer eng begrenzt sind (Sykes). -

TABELLE 1

(Auszugsweise nach Bingel)

Unterschiede der Thermoresistenz zwischen trockenem
und ungetrocknetem Virus

Virus	Empfindlichkeit:		Autoren
	feucht	trocken	
Maul- u. Klauenseuche	60° 10-30' +		Trautwein (1929)
			Wedemann (1949)
		52° 14 Std. -	Sicker u. Modrow
		70° 2,5 " -	" (1930)
		86° 7' -	"
		116° 8' -	"
		122° 3' -	"
		110° 5' -	engl. MKS-Kommission (1925-37)
		120° 3' -	
Lungenseuche (Pleuropneumonie)	55° 5' +	130° 1' -	
		60° 30' -	Zwick (1939)

TABELLE 2

(n. Bingel, zit. Gönnert u. Bock)

Resistenz trock. Theilervirus gegen feuchte u. trock.-
Hitze und feuchten Virus gegen feuchte Hitze

feuchtes Virus feuchte Hitze	angetrocknetes Virus feuchte Hitze	trockenes Virus trockene Hitze
100° 1' zum Teil noch unempfindlich	100° 4' empfindlich	120° 60' quantitativ empfindlich
100° 2' empfind- lich	100° 10' noch 0,1 ‰ bleiben aktiv	120° 75' empfindlich
58° 60' und län- ger unempfindlich		180° wird von einem Teil 5' getragen, 10' nicht mehr

TABELLE 3

(Auszugsweise nach Bingel)

Hitzedesinfektion von Viren

Virus	Temperatur	Zeit	Wirkung	Autoren
Herpes simplex	56 ⁰	30'	+	Löwenstein (1919/20)
Psittakose	55 ⁰	30'	-	Gordon (1930)
	80 ⁰	30'	+	Gordon (1930)
	60 ⁰	10'	+	Weyer (1952, Rivers (1948)
Lyssa	50 ⁰	60'	+	Celli (1887)
	50 ⁰	15'	+	Semple (1911)
	60-70 ⁰	2'	+	Babès (1889)
Influenza	56-58 ⁰	20-30'	+	Royen (1948)
	75 ⁰	15"		Bingel
	85 ⁰	3"		"
klassische Polio- myelitis	52, 5 ⁰	30'	$\frac{+}{-}$	Shanghnessy (1930)
	45 ⁰	30'	95% +	Kaplan u. Melnik (1952)
	60 ⁰	30'	+	" "
	60 ⁰	0,8'	+	" "
	80 ⁰	0,5'	+	Lépine u. Nantel (1951)
	50 ⁰	60'	$\frac{+}{-}$	Younger (1956)
Mäuse-Polio-ence- phalomyelitis (Theiler)	100 ⁰	1'	-	Gönnert u. Bock (1955)
	100 ⁰	2'	+	" "
	58 ⁰	60'	$\frac{+}{-}$	" "
	65 ⁰	30'	$\frac{+}{-}$	Lawson u. Melnik (1947)
	56 ⁰	30'	+	Gönnert u. Bock (1955)

TABELLE 4

(Auszugsweise nach Bingel)

Wirkung von UV-Strahlen auf Viren

Virus	Versuchsbedingung	Wirkg.	Autoren
Herpes		+	Levaditi (1942)
Influenza	Roh-Allantois	+	Horsfall (1948)
	Flüssigkeit 60'	-	Henle u. Henle (1944/46)
	nach Dialyse 30"	+	"
Lyssa	in kurzer Zeit	+	Sankaran u. Beer (1935)
Poliomyelitis	binnen Sekunden	+	Toomey (1947) Jungeblut (1938) Levaditi (1942)
Mumps	in kurzer Zeit u. ge- ringer Intensität	+	Habel (1945/46)
	intensives UV in 28"	+	
Virus-Schwei- ne-Pest	in Serum	-	Uhlenhut (1928)
Maul- u. Klau- enseuche	unfiltrierte Lymphe	+	Galloway u. Cidinow
	Filtrat 5-60'	+	(1928) Trautwein (1929)

TABELLE 5

(Auszugsweise nach Bingel)

Die virucide Wirkung von Formalin

Virus	Konzentrat.	Einwirkzeit	Wirkg.	Autoren
Rickettsien 300 - 500 m μ	0,1 ‰	einige Std.	+	Huebner (1943)
Psittakose 200 - 400 m μ	0,1 ‰	24-36 Std.	+	Weyer (1952)
Lyssa 150 - 200 m μ	0,15 ‰	24 Std.	+	Boeker (1939)
	1,0 ‰	24 Std.	+	Gallea (1930)
Influenza 100 - 120 m μ	0,08 ‰	8 Tage	+	Mc Lean (1945)
	0,01 ‰		$\pm$	Henle u. Henle (1946)
	2,0 ‰	30'	+	Bingel u. Lorenz (1955)
Encephalomyelitis 30 m μ	0,2 ‰	. / .	+	Zwick (1939)
Poliomyelitis 15 - 20 m μ	0,1 ‰	schnell 22 ⁰	+	Rooyen u. Rhodes (1948)
	0,1 ‰	2 Tage 0 ⁰	+	
Hepatitis ? m μ	0,1 ‰	3 - 4 Tage	+	Oesterle u. Jung- hans (1950)
Phagen T ₂	1,0 ‰	10'	+	Deutsch u. Rohr (1955)
	2,0 ‰	2,5'	+	
Pocken. Vaccine 100 - 200 m μ	0,2-0,3 ‰	8 Tage b. 37 ⁰	+	Iwanoff (1927) Lehmann (1939)

TABELLE 6

(Auszugsweise nach Bingel)

Die virucide Wirkung von Phenol

Virus	Konzentrat	Einwirkzeit	Wirkg.	Autoren
Rickettsien 300 - 500 m μ	0,5 ‰	. / .	+	Huebner (1949) Schlote (1948)
Psittakose 200 - 400 m μ	0,5 ‰	20 Std. b. 37°	-	v. Rooyen u. Rhodes (1948) Meyer (1948)
Lyssa 140 - 200 m μ	1 ‰	schnell	+	v. Rooyen u. Rhodes (1948)
Influenza 100 - 120 m μ	3 ‰ 1 ‰	3' 3'	(+) <u>+</u>	Dunham u. McNeal (1944) Horsfall (1948)
Herpes 100 - 150 m μ	1 ‰	. / .	+	Mariani zit. n. Gil- demeister (1939)
Poliomyelitis 15 - 20 m μ	1 ‰ 1 ‰	10 Tage 1 Monat	- -	Brodie (1935) Keller (1950) Kraus (1931)
Encephalomyelitis 30 m μ	3 ‰	. / .	+	Zwick (1939)
Louping-ill 15 - 20 m μ	0,5 ‰	. / .	+	Pool (1930) Lépine (1931)
Hepatitis ? m μ	0,25 ‰	1 Jahr	-	Med. Office Memo- randum (1945)

TABELLE 7

(Auszugsweise nach Bingel)

Die virucide Wirkung von Chlor

Virus	Desinfektionsmittel	Konzentrat.	Einwirkzt.	Wirkung	Autoren
Q-Fieber	Chlor	100 mg/l	12 Std.	-	Moscovici (1953)
		200 mg/l	"	+	"
	Restchlor	8-12 mg/l	30'	+	Bingel u. Sachse
Grippe	"	1,5-3,5 mg/l	30'	+	(1955)
	Chloramin	3,6 mg/l	30'	+	Bingel (1954/55)
	"	0,3 mg/l	30'	+	
Mumps	Aqua chlorata	0,3 mg/l	30'	+	
Maul-u.	Anfangschlor	5,5 mg/l	30'	+	Bingel (1955)
Klauenseuche	Chlorkalk		nach Stunden	+	Waldmann u. Nage (1939)
Pferdeencephalomyelitis (Osttyp)	Chlor	0,07 mg/l	60'	+	Kempf (1945)
Phagen	Chloramin	2,0 mg/l	60'	+	Bucca (1956)
	freies Chlor	0,02 mg/l	60'	(+)	"
	Natriumhypochlorit				
	Restchlor	0,04-0,07 mg/l	1'	+	Friberg u. Hammerström (1956)

III. HYGIENISCHE GESICHTSPUNKTE DER ZELLSTOFFIMPRÄGNATION MIT BAKTERICIDEN UND DESODORIERENDEN STOFFEN

Die saure Reaktion der Scheide, die durch den Umbau von Glykogen in Milchsäure durch die Döderlein'schen Vaginalbakterien gebildet und aufrecht erhalten wird, verhindert das Überwandern von in den anogenitalen Bezirken unvermeidbaren Keimen, z. B. *Escherichia coli*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Anaerobier* u. a. und das Überhandnehmen pathogener Keime im äußeren Genitale selbst. Deswegen ist unter normalen Bedingungen - d. h. im Intermenstruum - der enge Kontakt zwischen der Analöffnung als Ausscheidungsort zahlloser pathogener und apathogener Keime und das äußere weibliche Genitale kein großes Problem. Auch während der Menstruation ist diese Schutzfunktion ausreichend, obwohl Erkrankungen durch Infektion während der Menstruation durchaus möglich, jedoch nicht häufig sind (K. Baisch). - Ein besonderes Problem ergibt sich erst durch die unphysiologische Form des Menstruationsschutzes durch die Benutzung von Monatsbinden, d. h. das Menstruationsblut kann nicht abfließen, so wie es physiologisch wäre, sondern wird in der Vagina gestaut. Dabei kommt es zu einer bakteriellen Zersetzung des Bluteiweißes, zumal sich in diesem Medium bei einer Körpertemperatur von 37°C Keime aller Art vermehren. Darüber hinaus ist an die Möglichkeit einer ascendierenden Infektion als besondere Komplikation zu denken. -

Durch den Eiweißabbau entstehen geruchlich auffällige Stoffe, die psychisch stark belasten können. Wünschenswert ist deswegen eine Hemmung eiweißzersetzender Bakterien bzw. deren Abtötung, wobei allerdings die normalen Verhältnisse des Keimgleichgewichtes erhalten bleiben sollen. Letzteres ist aber sehr schwer zu erreichen, da Desinfektionsmittel die normalen Verhältnisse des Biotops ändern können. Darüber hinaus werden sie auch durch Eiweiß in ihrer Wirkung stark gemindert, so daß man mit verhältnismäßig großen Konzentrationen arbeiten müßte. Dabei wäre aber in hohem Maße eine Schädigung des Gewebes denkbar. Aus diesen Gründen wäre es besser, dem Zellstoff Substanzen hinzuzufügen, die durch Adsorption desodorieren. -

IV. DIE ANTIBAKTERIELLE WIRKUNG DER TESTSUBSTANZEN

1.) Versuchsanordnung

Zur Verfügung standen 3 Substanzen, nämlich die Al - Cu - Mg - Salze von Acetylaceton (Bezeichnung im Text: Al - Cu - Mg).

Untersucht wurde zunächst die Frage, ob die genannten Substanzen eine antibakterielle Wirkung besitzen und inwieweit ein Effekt durch verschiedene Milieubedingungen z. B. bei An- und Abwesenheit von Serum beeinflusst wird. -

A. 40 mg der Substanzen Al - Cu - Mg wurden in 8 ml Propanol heiß gelöst. Unmittelbar darauf wurden 2 ml dieser Lösungen einerseits zu 18 ml Bouillon und andererseits zu 18 ml 20 %iger Serumbouillon gegeben. Damit wurde eine Verdünnungsreihe angelegt und jede Verdünnungsstufe zu gleichen Teilen mit beimpfter Bouillon bzw. Serumbouillon vermischt. Die Endkonzentration an Testkeimen in jedem Röhrchen betrug 1/100 einer 20 Std. alten Kultur. Das Testergebnis wurde makroskopisch nach 20 stündiger Bebrütung kontrolliert. Die Wirkstoffkonzentration im 1. Röhrchen betrug 0,025 %. Die Tests wurden mit E.coli, Ps.aeruginosa, Bak.subtilis und Staph.aureus Sg 511 als Testkeim je in doppeltem Ansatz durchgeführt. Zur Kontrolle wurde Propanol ohne Wirkstoff in denselben Konzentrationen verwandt (Tab. 8). -

TABELLE 8

Bakteriostase der Wirkstoffe gegen verschiedene
Testkeime im Dilutionstest

Wirkstoff	Medium	Testkeim	Verdünnungsstufen			
			1	2	3	4
Propanol	Bouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
Propanol	Serumbouill.	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	+++	+++	+++
	"	Sg 511	+	+++	+++	+++
Al	Bouillon	E. coli	0	++	+++	+++
	"	"	0	++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+	+++	+++
Al	Serumbouill.	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	+	+++	+++
	"	Sg 511	+++	+++	+++	+++
	"	"	+++	+++	+++	+++

TABELLE 8

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Medium	Testkeim	Verdünnungsstufen			
			1	2	3	4
Cu	Bouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	0	+	+++
	"	"	0	0	+++	+++
Cu	Serumbouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+	+++	+++
	"	"	0	++	+++	+++
Mg	Bouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	B. proteus	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++		

TABELLE 8

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Medium	Testkeim	Verdünnungsstufen			
			1	2	3	4
Mg	Serumbouill.	E. coli	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
Mg	Serumbouill.	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	B. proteus	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
Wiederholung Propanol	Bouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	B. proteus	0	++	+++	+++
	"	"	0	++	+++	+++
Propanol	Serumbouill.	E. coli	0	0	+++	+++
	"	"	0	+	+++	+++
	"	Bac. subtilis	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+	+++
	"	"	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	"	0	+++	+++	+++
	"	B. proteus	0	0	+++	+++
	"	"	0	0	+++	+++

B. Versuch mit festen Nährböden zum Nachweis eines antibakteriellen Effektes

Auf Blutagarplatten wurden Ausstriche mit *B. proteus*, *Ps. aeruginosa*, Enterokokken, *E. coli*, *Staph. albus* und *Staph. aureus* Sg 511 angelegt. Auf diese Ausstriche wurde die Testsubstanz, d.h. Cu, Al und Mg gegeben und zwar bei Verwendung von Cu in einem Gewicht von etwa 50 mg und bei Verwendung von Al und Mg von etwa 90 mg. Die Fläche kann begreiflicherweise nicht genau angegeben werden. Der Versuch hatte nur den Zweck festzustellen, ob bei Verwendung von Al, Cu und Mg in Substanz u. U. doch etwas in Lösung geht, wodurch bei Bestehen einer antibakteriellen Wirkung eine Wachstumshemmzone festzustellen sein müßte (Tab. 9). -

TABELLE 9

Versuch mit festen Nährböden zum Nachweis eines antibakteriellen Effektes

Wirkstoff	Testkeim	Resultat
Cu	<i>E. coli</i>	mittelgroßer Hemmhof
	<i>Ps. aeruginosa</i>	kleiner Hemmhof
	<i>B. proteus</i>	mittelgroßer Hemmhof
	Enterokokken	mittelgroßer Hemmhof
	<i>Staph. albus</i>	mittelgroßer Hemmhof
	<i>Staph. aureus</i>	großer Hemmhof
Al	<i>E. coli</i>	kleine Hemmzone
	<i>Ps. aeruginosa</i>	kleine unbedeutende Hemmzone
	<i>B. proteus</i>	kleine Hemmzone
	Enterokokken	mittelgroße Hemmzone
	<i>Staph. albus</i>	mittelgroße Hemmzone
	<i>Staph. aureus</i>	kleine Hemmzone

TABELLE 9
(Fortsetzung)

Wirkstoff	Testkeim	Resultat
Mg	<i>E. coli</i>	kleine Hemmzone
	<i>Ps. aeruginosa</i>	große Hemmzone
	<i>B. proteus</i>	kleine unbedeutende Hemmzone
	Enterokokken	mittelgroße Hemmzone
	<i>Staph. albus</i>	kleine Hemmzone
	<i>Staph. aureus</i>	kleine Hemmzone
	Milchsäurebakterien	kleine Hemmzone

C. Versuche mit einer kalt gesättigten Lösung der Wirkstoffe
in Bouillon bzw. in Serumbouillon

Diese Versuche waren nach den oben beschriebenen Versuchen naheliegend.
Im einzelnen wurde so vorgegangen:

Die Testsubstanzen wurden im Überschuß zu Aqua dest. bzw. zu Bouillon und Serumbouillon gegeben, 24 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, der nicht gelöste Teil der Substanzen durch Zentrifugieren entfernt und die verbleibende Lösung im Auxanogrammverfahren (Lochtest mit Agarplatten, Lochdurchmesser 10 mm) gegen verschiedene Keimarten ausgetestet (Tab. 10). -

TABELLE 10

Ergebnis des Auxanogrammverfahrens mit wässrigen
Wirkstofflösungen

Wirkstoff	Lösungsmittel	Testkeim	Resultat Hemmstoffradius in mm
Cu	Aqua dest.	E. coli	0
	"	Ps. aerug.	0
	"	Sg 511	0
	"	Staph. aureus	0
	"	Staph. albus	0
	"	Enterokokken	0
	"	B. proteus	0
	"	Milchsäurebakt.	4,5
Cu	Serumbouillon	E. coli	0
	"	Ps. aerug.	0
	"	Sg 511	0
	"	Staph. aureus	0
	"	Staph. albus	0
	"	Enterokokken	0
	"	B. proteus	0
	"	Milchsäurebakt.	9,5
Al	Aqua dest.	E. coli	0
	"	Ps. aerug.	0
	"	Sg 511	0
	"	Staph. albus	0
	"	Enterokokken	0
	"	B. proteus	0
	"	Milchsäurebakt.	0
Al	Serumbouillon	E. coli	0
Mg	Aqua dest.	Ps. aerug.	0
Mg	Serumbouillon	Sg 511	0
		Staph. albus	0
		Enterokokken	0
		B. proteus	0
		Milchsäurebakt.	0

D. Bakteriostatischer Effekt einer gesättigten wässrigen
Lösung der Festsubstanzen

Verwandt wurde eine kalt gesättigte Lösung der Testsubstanz in Aqua dest. Diese Lösungen wurden im Dilutionstest mit geometrischen Verdünnungsstufen gegen verschiedene Testkeime unter Verwendung von Bouillon bzw. Serumbouillon und einer Verdünnung von 1:2 im 1. Röhrchen angesetzt. Die Ablesung erfolgte wie üblich nach 20 stündiger Bebrütung bei 37°C (Tab.11). -

TABELLE 11

Bakteriostatischer Effekt einer gesättigten wässrigen
Lösung der Testsubstanzen

Wirkstoff	Testmedium	Testkeim	Verdünnungsstufen			
			1	2	3	4
Cu	Bouillon	E. coli	0	+++	+++	+++
	"	B. proteus	+++	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	+++	+++	+++	+++
	"	Sg 511	0	+++	+++	+++
	"	Staph. albus	0	+++	+++	+++
	"	Enterokokken	0	+++	+++	+++
	"	Milchsäureb.	0	+++	+++	+++
Cu	Serumbouillon	E. coli	0	$\frac{+}{-}$	+++	+++
	"	B. proteus	0	0	$\frac{+}{-}$	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	0	+++	+++
	"	Staph. albus	0	0	0	+++
	"	Enterokokken	0	0	$\frac{+}{-}$	+++
	"	Milchsäureb.	0	0	0	+

TABELLE 11

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Testmedium	Testkeim	Verdünnungsstufen			
			1	2	3	4
Al	Bouillon	E. coli	+++	+++	+++	+++
	"	B. proteus	+++	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	+	+++	+++	+++
	"	Sg 511	+	+++	+++	+++
	"	Staph. albus	++	+++	+++	+++
	"	Enterokokken	+	+++	+++	+++
	"	Milchsäureb.	0	+++	+++	+++
Al	Serumbouillon	E. coli	+++	+++	+++	+++
	"	B. proteus	+++	+++	+++	+++
	"	Ps. aerug.	+++	+++	+++	+++
	"	Sg 511	+++	+++	+++	+++
	"	Staph. albus	+++	+++	+++	+++
	"	Enterokokken	+++	+++	+++	+++
	"	Milchsäureb.	+++	+++	+++	+++
Mg	Bouillon	E. coli	0	0	+++	+++
	"	B. proteus	0	+	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	0	+++	+++
	"	Staph. albus	0	0	+++	+++
	"	Enterokokken	0	0	+	++
	"	Milchsäureb.	0	0	+++	+++
Mg	Serumbouillon	E. coli	0	0	++	+++
	"	B. proteus	0	0	+++	+++
	"	Ps. aerug.	0	0	+++	+++
	"	Sg 511	0	0	+	+++
	"	Staph. albus	0	0	++	+++
	"	Enterokokken	0	++	+++	+++
	"	Milchsäureb.	0	0	+++	+++

2. Ergebnisse

Aus den in Tab.8 wiedergegebenen Versuchen ist zu entnehmen, daß die Bakteriosasewerte bei mehrfachem Ansatz manchmal um eine Verdünnungsstufe schwanken, was als üblicher Fehler bekannt ist. Die mit Wirkstoff erhaltenen Bakteriosasewerte entsprachen den Proponalkontrollen. Es sei betont, daß die Proponalkonzentrationen in den Kontrollen denen in den Versuchen entsprachen. Somit kann also gesagt werden, daß mit dieser Methode ein antibakterieller Effekt der Testsubstanzen Al, Cu und Mg nicht nachweisbar ist. -

Die in Tab.9 zusammengestellten Resultate weisen darauf hin, daß im Gegensatz zum Dilutionstest bei Verwendung von Substanz offensichtlich geringe Mengen in Lösung gehen müssen, mit denen im Plattenversuch ein bakteriostatischer Effekt nachgewiesen werden kann. Der negative Befund im Dilutionstest (Tab.8) kann damit erklärt werden, daß bei den gewählten Verdünnungsgraden die Wirkstoffkonzentration zu klein war. Andererseits zeigen die Versuche aus Tab.9, daß wohl nur wenig Wirkstoff in Lösung geht, so daß nur in der näheren Umgebung eine Zone der Wachstumshemmung auf festen Nährböden zu beobachten war. -

Die in Tab.10 wiedergegebenen Resultate scheinen nicht den Ergebnissen zu entsprechen, die durch Aufgabe der Testsubstanz auf einen Bakterienausstrich auf festen Agarplatten ermittelt wurden. Da bekanntermaßen das Auxanogrammverfahren erst bei höheren Wirkstoffkonzentrationen ein Resultat gibt im Verhältnis zum Dilutionstest, wurde noch ein Versuch mit letzterer Methode angesetzt (Tab.11). -

Aus Tab.11 ist zu entnehmen, daß besonders mit den Substanzen Cu und Mg sowohl mit Bouillon als auch mit Serumbouillon gegen die meisten verwandten Testkeime einschließlich Milchsäurebakterien eine antibakterielle Aktivität nachweisbar ist, wenn eine wässrige kalt gesättigte Lösung benutzt wird. Fast keine Wirkung ist nachweisbar mit der Substanz Al. Damit werden die in Tab.9 beschriebenen Versuche verständlich (Auflage von Testsubstanz auf Ausstriche von Testkeimen auf einem festen Medium). Gleichzeitig ist der negative Befund beim Dilutionstest nach Lösung in Propanol erklärlich, da hierbei eine zu große Verdünnung gewählt wurde. -

In Verbindung mit den seither beschriebenen Versuchen schien es von Interesse festzustellen, ob die Propanolbehandlung der Wirkstoffe u. U. einen Einfluß hat. Die Testsubstanzen Al und Cu wurden wie üblich in heißem Propanol gelöst und mit Aqua dest. eine Verdünnung hergestellt, die der

Wirkstoffkonzentration im 1. Röhrchen des Dilutionstestes (Siehe Tab. 8) entsprach. Nach völligem Eintrocknen wurde eine keimhaltige Bouillon (Staph. aureus Sg 511) bis zur Erreichung des ursprünglichen Volumens zugegeben. Nach 20-stündiger Bebrütung konnte keine Hemmung des Keimwachstums festgestellt werden. Dieses Ergebnis entspricht also durchaus den seitherigen Versuchen.

V. DIE DESODORIERENDE WIRKUNG DER TESTSUBSTANZEN

1. Versuchsanordnung

Eine wesentliche Frage ist die, ob die Testsubstanzen in der Lage sind, Geruchsstoffe zu binden. Dabei muß abgegrenzt werden, ob der Verlust einer Geruchsqualität über eine Beeinflussung des Bakterienstoffwechsels oder über eine direkte Bindung von Geruchsstoffen zustande kommt. -

Zunächst wurde deswegen die Möglichkeit einer Bindung von Geruchsstoffen (ohne Bakterien) untersucht. Verwandt wurden dazu Ammoniak und Capronsäure. Als Testsubstanzen dienten Al, Cu und Mg. Da diese Substanzen in Propanol gelöst werden, wurde noch eine Propanolkontrolle angefügt. -

A. Das Prinzip des Versuches besteht darin, daß Verdünnungen der Geruchsstoffe hergestellt werden, zu denen in gleichen Volumina die Wirkstofflösung zugegeben wird (mehrere Reihen mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen). Mit 8 Probanden wurde dann bei jeder Reihe unmittelbar nach Ansatz des Versuches sowie eine Stunde und 3 Stunden später das minimum perceptibile der Geruchsqualität festgestellt. -

Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß in Petrischalen (Durchmesser 10 cm) 10 ml der in der Tabelle angegebenen Verdünnungen des Wirkstoffs gegeben wurden. Dazu kamen dann 10 ml der gewünschten Konzentration der Testsubstanz. Zur Lösung der Testsubstanzen wurden 20 mg in 8 ml Propanol heiß gelöst, mit Aqua dest. 1:5 verdünnt, so daß bei einer weiteren Verdünnung 1:2 in der Petrischale eine Wirkstoffkonzentration von 0,025 % und eine Propanolendverdünnung von 1:10 vorlag. In weiteren Reihen wurde die Hälfte bzw. ein Viertel dieser Wirkstoffkonzentration und in der Kontrolle eine entsprechende Propanolverdünnung benutzt (Ergebnisse siehe Tab. 12). -

TABELLE 12

Versuche zur Wirkstoffbindung

Bestimmung des minimum perceptibile = m.p.

Wirkstoff	Zeit n. Stunden	Ammoniakverdünnung 1:					
		50	100	500	1000	5000	10 000
Aqua dest.	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Propanol 1:10	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Propanol 1:20	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Propanol 1:40	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Cu 0,025%	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Cu 0,0125%	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		
Cu 0,006%	0				m.p.		
	1				m.p.		
	3				m.p.		

TABELLE 12

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Zeit n. Stunden	Ammoniakverdünnung 1:					
		50	100	500	1000	5000	10 000
Al 0,025 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Al 0,0125 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Al 0,006 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Mg 0,025 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Mg 0,0125 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Mg 0,006 %	0				m. p.		
	1				m. p.		
	3				m. p.		
Capronsäureverdünnung 1:50			100	500	1000	5000	10 000
Aqua dest.	0						m. p.
	1						m. p.
	3						m. p.

TABELLE 12

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Zeit n. Stunden	Capronsäureverdünnung 1:					
		50	100	500	1000	5000	10 000
Propanol 1:10	0				m.p.		
	1					m.p.	
	3				m.p.		
Propanol 1:20	0						m.p.
	1						m.p.
	3						m.p.
Propanol 1:40	0						m.p.
	1						m.p.
	3						m.p.
Cu 0,025 %	0			m.p.			
	1			m.p.			
	3					m.p.	
Cu 0,0125 %	0				m.p.		
	1					m.p.	
	3					m.p.	
Cu 0,006 %	0				m.p.		
	1					m.p.	
	3					m.p.	
Al 0,025 %	0					m.p.	
	1					m.p.	
	3					m.p.	
Al 0,0125 %	0					m.p.	
	1					m.p.	
	3					m.p.	

TABELLE 12

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Zeit n. Stunden	Capronsäureverdünnung 1:					
		50	100	500	1000	5000	10 000
Al 0,006 %	0					m.p.	
	1					m.p.	
	3					m.p.	
Mg 0,025 %	0					m.p.	
	1					m.p.	
	3			m.p.			
Mg 0,0125 %	0					m.p.	
	1					m.p.	
	3					m.p.	
Mg 0,006 %	0					m.p.	
	1						m.p.
	3						m.p.

B. In den seitherigen Versuchen war festgestellt worden, daß eine direkte Wirkstoffbindung nicht oder zumindest nicht in ausgeprägtem Maße vorhanden ist. Zu klären bleibt die Frage, ob die Wirkstoffe in einer subbakteriostatischen Konzentration in der Lage sind, Fermentsysteme des Eiweißabbaus zu beeinflussen. Als Modell wurde für diese Versuche die H_2S -Bildung durch Proteusbakterien gewählt. -

Im einzelnen wurde so vorgegangen, daß in Reagenzgläsern Bouillon bzw. Serumbouillon (20 % Serum) mit Proteusbakterien gegeben wurde. Hinzugefügt wurde eine Lösung der Wirkstoffe Cu, Al und Mg zu gleichen Teilen. Die Wirkstofflösungen wurden wie eingangs beschrieben durch Lösung in heißem Propanol und Weiterverdünnung in Bouillon bzw. Serumbouillon hergestellt. Als Kontrolle dienten Lösungen von Propanol allein in den entsprechenden Konzentrationen. In die Reagenzgläser wurde mit einem Abstand von etwa 0,5 cm von der Kulturoberfläche ein Filterpapierstreifen

mit Bleiazetat eingehängt. Nach 24- und 48-stündiger Bebrütung wurde das Keimwachstum und die H_2S -Bildung an Hand der Schwärzung des Bleiazetats abgelesen (Ergebnisse siehe Tab.13). -

TABELLE 13

Beeinflussung der H_2S -Bildung durch die untersuchten Wirkstoffe

(Testkeim: Proteusbakterien)

Wirkstoff	Medium	H_2S	24 Std. Wachstum	H_2S	48 Std. Wachstum
-	Bouillon	+++	+++	+++	+++
Propanol 1:20	"	0	0	0	0
Propanol 1:40	"	0	0	0	+
Propanol 1:80	"	+++	+++	+++	+++
Propanol 1:160	"	+++	+++	+++	+++
-	Serumb.	+++	+++	+++	+++
Propanol 1:20	"	0	0	0	0
Propanol 1:40	"	0	klar, Satz	0	klar, Satz
Propanol 1:80	"	+	+	+	Satz +++
Propanol 1:160	"	+++	+++	+++	+++
Cu 0,0125%	Bouillon	0	0	0	0
Cu 0,006 %	"	0	+	0	+
Cu 0,003 %	"	0	+++	0	+++
Cu 0,0015 %	"	++	+++	+++	+++
Cu 0,0125%	Serumb.	0	0	0	0
Cu 0,006 %	"	0	klar, Satz	0	klar, Satz
Cu 0,003 %	"	0	Satz <u>+</u>	0	++
Cu 0,0015 %	"	0	Satz ++	<u>+</u>	+++

TABELLE 13

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Medium	H ₂ S	24 Std. Wachstum	H ₂ S	48 Std. Wachstum
Al 0,0125 %	Bouillon	0	0	0	0
Al 0,006 %	"	0	+	++	+
Al 0,003 %	"	+++	+++	+++	+++
Al 0,0015 %	"	+++	+++	+++	+++
Al 0,0125 %	Serumb.	0	0	0	0
Al 0,006 %	"	0	klar, Satz	0	klar, Satz
Al 0,003 %	"	+	Satz +++	+	Satz +++
Al 0,0015 %	"	+	Satz +++	+	Satz +++

Für die weiteren Versuche wurde eine neue Propanolkontrolle verwandt.

Wirkstoff	Medium	H ₂ S	24 Std. Wachstum	H ₂ S	48 Std. Wachstum
-	Bouillon	+++	+++	+++	+++
Propanol 1:10	"	0	0	0	0
Propanol 1:20	"	0	0	0	0
Propanol 1:40	"	0	0	0	Satz, klar
Propanol 1:80	"	+++	+++	+++	+++
-	Serumb.	+++	+++	+++	+++
Propanol 1:10	"	0	0	0	0
Propanol 1:20	"	0	0	0	0
Propanol 1:40	"	0	Satz <u>+</u>	0	Satz <u>+</u>
Propanol 1:80	"	0	Satz	+++	+++

TABELLE 13

(Fortsetzung)

Wirkstoff	Medium	H ₂ S	24 Std. Wachstum	H ₂ S	48 Std. Wachstum
Mg 0,0125 %	Bouillon	0	Satz, klar	0	Satz, klar
Mg 0,006 %	"	+++	+++	+++	+++
Mg 0,003 %	"	+++	+++	+++	+++
Mg 0,0015 %	"	+++	+++	+++	+++
Mg 0,0125 %	Serumb.	0	0	0	0
Mg 0,006 %	"	0	Satz, klar	0	Satz, <u>+</u>
Mg 0,003 %	"	0	+++	++	+++
Mg 0,0015 %	"	+++	+++	+++	+++

2. Ergebnisse

Aus Tab.12 ist zu entnehmen, daß bei Verwendung von Ammoniak als Geruchsstoff durch Al, Cu und Mg im Verhältnis zur Propanolkontrolle keine Verschiebung des m. p. eintritt, so daß also keine Geruchsstoffbindung angenommen werden kann. -

Im Gegensatz dazu gewinnt man bei Verwendung von Capronsäure den Eindruck, daß gegenüber der Propanolkontrolle durch Al, Cu und Mg eine Verschiebung des m. p. eintritt und zwar in der Weise, daß geringere Verdünnungen - d.h. höhere Capronsäurekonzentrationen - erforderlich sind, um den Geruch noch wahr zu nehmen. Alle drei Testsubstanzen verhalten sich in etwa gleichmäßig. Dies würde bedeuten, daß möglicherweise eine Geruchsstoffbindung eintrat. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß die Unterschiede zwischen Versuch und Kontrolle recht klein sind. -

Aus Tab.13 geht hervor, daß die Kontrollen ohne Wirkstoffzugabe - d.h. also auch ohne Propanol - in jedem Fall eine deutliche H₂S-Bildung zeigen. Die Propanolkontrollen bei der ersten und zweiten Serie zeigen einen kleinen Unterschied bei der Verdünnung 1:80. Dies ist aber insofern nicht ausschlaggebend, als diese Propanolkontrollen lediglich zeigen, daß eine H₂S-Bil-

dung nur bei makroskopisch deutlich sichtbarem Wachstum nachweisbar ist. Die Auswertung der Versuche mit den Wirkstoffen Al, Cu und Mg zeigen dagegen, daß bei bestimmten Verdünnungsgraden einerseits ein voll ausgebildetes makroskopisch sichtbares Wachstum der Testkeime stattfand, jedoch ohne H_2S -Bildung. Verwiesen sei besonders auf das sehr deutliche Ergebnis mit Cu 0,003 % in Bouillon oder mit Cu 0,0015 % in Serumbouillon, mit Mg 0,003 % in Serumbouillon, nicht aber in Bouillon ohne Serumzusatz und bedingt auch das Ergebnis mit Al 0,006 % in Bouillon, nicht aber in Serumbouillon. Diese Resultate weisen auch ohne quantitative Auswertung darauf hin, daß besonders Cu und Mg, weniger Al in der Lage sind, trotz voll entwickelten Keimwachstums die H_2S -Bildung zu verzögern. Bei einer längeren Bebrütungszeit von 48 Stunden tritt dann die H_2S -Bildung doch noch auf. In diesem Ergebnis wird eine Erklärung für die desodorierende Wirkung der Testsubstanzen durch eine partielle Blockierung eiweißabbauender Systeme der Mikroorganismen gesehen. Dieses Ergebnis stimmt sehr gut mit den vor genannten Versuchen überein, wonach trotz wenig ausgeprägter Bakteriostase bei kurzfristigen Versuchen das Auftreten stark riechender Geruchsstoffe aus dem Eiweißabbau verzögert wird. -

VI. DIE VIRUSAKTIVE WIRKUNG DER TESTSUBSTANZEN

1. Versuchsanordnung

Die dritte zu klärende Frage war die, ob die drei Testsubstanzen Al, Cu und Mg einen viruciden Effekt besitzen, was jeweils mit drei Virusstämmen ausgetestet wurde. -

Gearbeitet wurde mit ungereinigtem Herpes-, Encephalomyocarditis (EMC)- und Influenzaviren. Dabei kann der Herpesstamm als Typ eines Virus mit besonders großer Resistenz gegen chemische Substanzen angesehen werden. Nach der im Institut üblichen Methode wird virushaltiges Material in Kochsalz-Glyzerinlösung bei -20° bis $-25^{\circ}C$ in der Tiefkühltruhe aufbewahrt. Das virushaltige Gewebe wird durch Sektion infizierter Tiere (weiße Mäuse) gewonnen; dabei werden die Organe herauspräpariert, in denen sich die Viren auf Grund ihrer Pathogenität maximal ansammeln, bei Herpes und EMC das Hirn, bei Influenza die Lunge. Bei der Herstellung virushaltiger Organ suspensionen wird das eingefrorene Material etwa 15 Stunden im Kühlschrank aufgetaut, mit steriler Ringerlösung 1:10 verdünnt, homogenisiert (Hirn in der Schüttelflasche mit Glasperlen, Lunge im sterilen Mörser mittels

Quarzsand) und 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Der zentrifugierte Überstand dient zur Infektion neuer Tiere, die Verdünnung der gewonnenen Organ-Virussuspension beträgt 1:10. -

Die Testsubstanzen Al, Cu und Mg wurden ausgewogen (Löslichkeit siehe Tab. 14) und in einem sterilen Erlenmeierkolben mit je 10 ml Serum bzw. Normalbouillon versetzt. Vor der Verarbeitung wurden die Lösungen einen Tag im Kühlschrank aufbewahrt (Cu löste sich in der angegebenen Menge nicht restlos in Serum und Normalbouillon; benutzt wurde der zentrifugierte Rückstand). -

TABELLE 14

Löslichkeitstabelle

	H ₂ O	Normal- Bouill.	20% Serum- Bouill.	Serum
Al-Salz	0,43 %	0,40 %	0,44 %	0,33 %
Cu-Salz	0,01 %	0,11 %	0,12 %	0,084 %
Mg-Salz	1,5 %	0,63 %	0,62 %	0,85 %

Zur Austestung einer viruciden Wirkung wurden 0,5 ml virushaltiger Organsuspension und 0,5 ml der Testsubstanz im Reagenzglas gemischt und 1 Stunde bei +37°C einwirken lassen; daraufhin wurde diese Lösung weißen Mäusen injiziert (siehe Übersichtstabelle). -

TABELLE 15

Allgemeine Versuchsanordnung

(Übersicht)

	Herpes	EMC	Influenza
Versuchstiere:	weiße Mäuse		
Aufbewahrung:	Hirn und Lungen in NaCl-Glyzerin bei -20°C		
Aufbereitung d. Organsuspension:	Mäusehirn (-Lunge) + 2,7 ml Ringer, homogenisieren, 10' zentrifugieren 3000 U/min		
Versuchsansatz:	0,5 ml virushaltige Organsuspension + 0,5 ml zu testender Substanz im Reagenzglas 60' bei + 37°C einwirken lassen		
Beobachtungsdauer:	21 Tage		
Kontrolle auf intaktes Virus:	Tod der Tiere		
Größe der Kollektive:	5 Tiere		
Gewicht der Kollektive:	80 - 85 g		
pH:	7,36		
Lösungsmittel der Testsubstanzen:	Normalbouillon und Serum		
Verdünnungsmittel der Organsuspension:	steril. Ringerlösung		
Verdünnung der Organsuspension:	10 ⁻³		
Infektionsmodus:	0,03 ml intracerebral	0,2 ml subcutan	4 Tropfen intranasal

Übersicht über die Reihenfolge der beschriebenen Versuche

A. Versuche mit Herpes-Virus

- α) Tierpassagen
- β) Bestimmung der LD 50 zur Feststellung der absolut tödlichen Dosis
- γ) Austestung der Substanzen
- δ) Bestimmung der Toxizität der Substanzen
- ε) Bestimmung der endgültigen LD 50 zur Berechnung der Versuchsdosis

B. Versuche mit EMC-Virus

α) - ε) wie A. α) - ε)

C. Versuche mit Influenza-Virus

α) - ε) wie A. α) - ε)

A. Versuche mit Herpes-Virus

α) Tierpassagen

Da durch längeres Aufbewahren virushaltigen Materials in der Tiefkühltruhe die Virulenz der Stämme abnimmt, wurden 2 Tierpassagen gemacht. Ein wie oben aufbereitetes Material wurde 4 Mäusen injiziert. Nach Absterben der Tiere wurden die Hirne entnommen und nach Aufbereitung weiteren 5 Tieren injiziert (2. Passage). Die 4 Tiere, deren Gehirn zur Herstellung der Virussuspension diente, waren mit einer Virussuspension nach Verdünnung auf 10^{-2} , 10^{-6} , 10^{-3} und 10^{-2} infiziert worden (Tab.16).-

TABELLE 16

Überlebenszeit der Passagetiere

1. Passage		2. Passage	
Tier Nr.	Überlebenszeit in Tagen	Tier-Nr.	Überlebenszeit in Tagen
1	4	1	Ø
2	7	2	Ø
3	6	3	1
4	11	4	2
		5	2

Zeichenerklärung: Ø = < 1/2 Tag = unspezifisch

A

β) Bestimmung der LD 50 zur Feststellung der absoluten tödlichen
Versuchsdosis (Herpes-Virus)

Zur Bestimmung der LD 50 wurde eine Verdünnungsreihe der Virussuspension
(Passagegehirn von 4 Tieren) von 10^{-1} bis 10^{-10} angesetzt. -

TABELLE 17

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10^{-1}	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	0	0	0
10^{-6}	+	+	+	+	0
10^{-7}	+	0	0	0	0
10^{-8}	0	0	0	0	0
10^{-9}	+	0	0	0	0
10^{-10}	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung:

+ = Tier ging ein

0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht
ein

Auswertung der Tab. 17 (nach van Rooyen und Rhodes)
(Berechnung der LD 50)

Verdünnung	Tot/gesamt	überlb.	tot	tot	überlb.	Tot/gesamt	% Mortalität
10^{-1}	5/5	0	5	28	0	28/28	100
10^{-2}	5/5	0	5	23	0	23/23	100
10^{-3}	5/5	0	5	18	0	18/18	100
10^{-4}	5/5	0	5	13	0	13/13	100
10^{-5}	2/5	3	2	8	3	8/11	72,7
10^{-6}	4/5	1	4	6	4	6/10	60
10^{-7}	1/5	4	1	2	8	2/10	20
10^{-8}	0/5	5	0	1	13	1/14	7,14
10^{-9}	1/5	4	1	1	17	1/18	5,6
10^{-10}	0/5	5	0	0	22	0/22	0

Abstandsfaktor: 0,2500
+ - 6,0000

log LD 50 : - 6,2500

LD 50 = $0,56 \cdot 10^{-6}$

Die 50 % Mortalität liegt bei der benutzten Organsuspension bei etwa 10^{-6} ; daraus geht hervor, daß eine tausend mal stärkere Konzentration (10^{-3}) absolut tödlich sein muß.

A

γ) Austestung der Substanzen (Al, Cu, Mg) (Herpes-Virus)

Ausgangsmaterial: 4 Mischhirne von Tieren, die auf Grund einer Infektion eingegangen waren. Lösungsmittel: Normalbouillon und Serum. -

TABELLE 18

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschn. Lebens- dauer in Stunden
	1	2	3	4	5	
1. Vir-NB-Al	12	12	12	12	12	12
2. Vir-NB-Cu	12	12	12	0	0	
3. Vir-NB-Mg	24	26	37	45	85	43,4
Ring-NB-Al	13	13	13	109	113	52,2
Ring-NB-Cu	14	14	14	0	0	
Ring-NB-Mg	114	0	0	0	0	
Ring-NB	116	0	0	0	0	
4. Vir-Ser-Al	13	85	89	0	0	
5. Vir-Ser-Cu	13	26	0	0	0	
6. Vir-Ser-Mg	26	37	37	61	61	44,4
Ring-Ser-Al	52	62	69	110	114	81,1
Ring-Ser-Cu	14	278	0	0	0	
Ring-Ser-Mg	62	0	0	0	0	
Ring-Ser	14 ^x	114 ^x	0	0	0	
Vir-NB	12	19	20	36	36	24,6
Vir-Ser	16	17	19	20	36	21,6
Vir-Ring	13	15	20	21	45	22,8

Zeichenerklärung: Vir = Virus

NB = Normalbouillon

S = Serum

x = nicht spezifisch

Ring = Ringer

0 = Tier ging während
der Beobachtungsz.
nicht ein

A

ε) Zur Bestimmung der LD 50 wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-9} angesetzt um festzustellen, mit welchem Infektionstiter wirklich gearbeitet worden ist. -

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie bei dem in Tab.18 beschriebenen Versuch. Verdünnungsmittel: Sterile Ringerlösung.

TABELLE 19

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	1	2	3	4	5
10^{-1}	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	0
10^{-7}	+	0	0	0	0
10^{-8}	+	0	0	0	0
10^{-9}	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging ein.

0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

Auswertung der Tab. 19

(Berechnung der LD 50)

Virusver- dg.	tot/gesamt	überlb.	tot	tot	überlb.	tot/gesamt	% Morta- lität
10 ⁻¹	5/5	0	5	31	0	31/31	100
10 ⁻²	5/5	0	5	26	0	26/26	100
10 ⁻³	5/5	0	5	21	0	21/21	100
10 ⁻⁴	5/5	0	5	16	0	16/16	100
10 ⁻⁵	5/5	0	5	11	0	11/11	100
10 ⁻⁶	4/5	1	4	6	1	6/7	85,9
10 ⁻⁷	1/5	4	1	2	5	2/7	28,6
10 ⁻⁸	1/5	4	1	1	9	1/10	10
10 ⁻⁹	0/5	5	0	0	14	0/14	0

Abstandsfaktor: 0,6265

+ - 6,0000

log LD 50 : - 6,6265

LD 50 = 0,24 · 10⁻⁶

Umrechnung auf 10⁻³ : $\frac{10^{-3}}{0,24 \cdot 10^{-6}} = \frac{10^3}{0,24} = 1000 : 0,24$

(=gewählte Verdünnung
im Versuch)

4166,7 x LD 50 = Infektionsmodus im Versuch

A

δ) Bestimmung der Toxizität der Substanzen (Herpes-Virus)

Da die Al - Cu - Mg - Salze in der angegebenen Konzentration intracerebral gespritzt schon toxisch wirken (siehe Tab. 18), wurden zur Feststellung der verträglichen Konzentration die Salze mit Serum auf 1/2, 1/4 und 1/8 der Anfangskonzentration weiterverdünnt und je 5 Tieren intracerebral gespritzt.

Ausgangsmaterial: Salze in verschiedenen Konzentrationen.
Verdünnungsmittel: Serum.

TABELLE 20

Bestimmung der nicht toxischen Konzentration der
Testsubstanzen unter den Versuchsbedingungen

Wirkstoff	Endkonzentration in % Sättigg.	1	2	3	4	5
Al	50	+	+	+	+	+
	25	+	+	+	+	+
	12,5	+	+	0	0	0
Cu	50	+	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0
	12,5	0	0	0	0	0
Mg	50	+	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0
	12,5	+	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging innerhalb d. Beobachtungszeit ein,
0 = Tier ging innerhalb d. Beobachtungszeit nicht ein.

A

8) Austestung der Substanzen bei veränderten Konzentrationen
(Herpes-Virus)

Nach den in Tab. 20 wiedergegebenen Resultaten wurde der Hauptversuch mit Herpes-Virus nochmal durchgeführt und zwar mit sicher nicht tödlichen Konzentrationen der Testsubstanzen. -

Für den Versuch mit Al wurde eine Endkonzentration entsprechend einer 6,25%igen Sättigung, mit Cu mit einer 25%igen und mit Mg mit einer 25%igen Sättigung benutzt (Ergebnisse siehe Tab. 21). -

Ausgangsmaterial: 4 infizierte Mischhirne.
Verdünnungsmittel: Serum.
Konzentration der Testsubstanzen siehe Text.

TABELLE 21

Austestung der Substanzen bei veränderter Konzentration
(Zeichenerklärung siehe Tab.18)

Verimpfte Lösungen	Endkonzentration in % Sättig.	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überl.zt. in Std.
		1	2	3	4	5	
7. Vir-Ser-Al	6,25	26	31	40	47	52	39,2
8. Vir-Ser-Cu	25	400	424	0	0	0	
9. Vir-Ser-Mg	25	26	47	64	74	88	59,6
Ring-Ser-Al	6,25	0	0	0	0	0	
Ring-Ser-Cu	25	0	0	0	0	0	
Ring-Ser-Mg	25	0	0	0	0	0	
Ring-Ser		0	0	0	0	0	
Vir-Ser		28	31	40	47	64	42
Vir-Ring		40	40	42	47	64	46,7

A

g) Austestung von Cu bei vergrößertem Kollektiv (Herpes-Virus)

Aus Tab.21 ist zu entnehmen, daß die verwandten Wirkstoffkonzentrationen nicht toxisch sind. Cu hat offensichtlich eine günstige Wirkung in der verwandten Konzentration auf Herpes-Virus. Deswegen wurde der Versuch mit Cu und Serum als Medium nochmals mit einem größeren Kollektiv (15 Tiere) wiederholt (Ergebnisse siehe Tab.22). -

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie bei den in Tab.21 wiedergegebenen Versuchen. -

Endkonzentration des Cu: 25% (s. Tab.21).

TABELLE 22

Austestung von Cu bei verändertem Kollektiv

Verimpfte- Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
10. Vir-Ser-Cu	0	0	0	0	0	
	17 Tg.	0	0	0	0	
	20 Tg.	0	0	0	0	
Ring-Ser-Cu	0	0	0	0	0	
Ring-Ser	0	0	0	0	0	
Vir-Ser	19	23	34	43	56	36,3
Vir-Ring	19	23	34	43	56	36,3

Zeichenerklärung: siehe Tab.18
0 = Tiere überlebten

A

ε) Bestimmung der LD 50

Zur Feststellung der im Versuch wirklich verwandten Infektionsdosis wurde die LD 50 bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-9} angesetzt und mit diesem Material in üblicher Weise infiziert. -

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie bei dem in Tab.22 beschriebenen Versuch.

TABELLE 23

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	1	2	3	4	5
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	0
10 ⁻⁶	+	0	0	0	0
10 ⁻⁷	+	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging ein während der Beobachtungszeit.

0 = Tier ging nicht ein während der Beobachtungszeit.

Auswertung der Tab. 23

Virus-verdg.	tot/gesamt	überlbd.	tot	tot	überlebd.	tot/gesamt	% Mortalität
10 ⁻²	5/5	0	5	21	0	21/21	100
10 ⁻³	5/5	0	5	16	0	16/16	100
10 ⁻⁴	5/5	0	5	11	0	11/11	100
10 ⁻⁵	4/5	1	4	6	1	6/7	85,71
10 ⁻⁶	1/5	4	1	2	5	2/7	28,57
10 ⁻⁷	1/5	4	1	1	9	1/10	10
10 ⁻⁸	0/5	5	0	0	14	0/14	0
10 ⁻⁹	0/5	5	0	0	19	0/19	0

$$\begin{array}{rcl} \text{Abstandsfaktor:} & & 0,6249 \\ & + & - 6,0000 \\ \hline \end{array}$$

$$\text{Log LD 50} \quad : \quad - 6,6249$$

$$\text{LD 50} \quad = \quad 0,24 \cdot 10^{-6}$$

Umrechnung auf 10^{-3} : (benutzte Dosis im Versuch)

$3846,2 \times \text{LD 50} =$ im Versuch benutzte Infektionsdosis.

Aus Tab.22 ist zu entnehmen, daß Cu einen deutlich viruciden Einfluß auf Herpes-Virus hat. -

B. Versuche mit Encephalomyocarditis (EMC)-Virus

α) Tierpassagen

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Virussuspension dienten die Hirne von 4 Tieren, die mit einer Virussuspension nach Verdünnung auf 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} und 10^{-6} infiziert waren (Tab.24). Mit dem wie oben beschriebenen aufbereiteten Material wurden in 1. und 2. Passage je 2 Tiere beimpft. -

TABELLE 24

Überlebenszeit der Passagetiere

1. Passage		2. Passage	
Tier-Nr.	Überlebenszeit in Tagen	Tier-Nr.	Überlebenszeit in Tagen
1	3	1	2
2	4	2	3

B

β) Bestimmung einer absolut tödlichen Versuchsdosis (EMC-Virus)

Zur Bestimmung einer absolut tödlichen Arbeitsdosis wurde eine Verdünnungsreihe der Organ-Virussuspension von 10^{-1} bis 10^{-8} angesetzt (Tab.25)-

Ausgangsmaterial: Passagehirn von 2 Tieren. Verdünnungsmittel: sterile Ringerlösung.

TABELLE 25

Bestimmung der Arbeitsdosis

Verdünnung	Tier 1	Tier 2
10^{-1}	+	+
10^{-2}	+	+
10^{-3}	+	+
10^{-4}	+	+
10^{-5}	+	0
10^{-6}	+	0
10^{-7}	0	0
10^{-8}	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging während d. Beobachtungszeit ein.

0 = Tier ging nicht während d. Beobachtungszt. ein.

Nach dem in Tab.25 wiedergegebenen Resultat wurde in den folgenden Versuchen eine Verdünnung der Organ-Virussuspension von 10^{-3} gewählt. Wenn diese Dosis auch mit großer Wahrscheinlichkeit letal ist, so wurde dennoch bei jedem Hauptversuch die Infektionsdosis in x-facher LD 50 bestimmt. -

B

⌘) Austestung der Substanzen Al-Cu-Mg (EMG-Virus)

Ausgangsmaterial: 4 Mischhirne von Passagetieren (Tab.25).

Wirkstoffkonzentration (Endkonzentration in % Sättigung).

Al : 50

Cu : 50

Mg : 50

Lösungsmittel: Normalbouillon und Serum.

TABELLE 26

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
11. Vir-NB-Al	64	64	73	90	93	76,8
12. Vir-NB-Cu	61	71	85	91	109	83,4
13. Vir-NB-Mg	61	61	70	72	74	67,6
Ring-NB-Al	0	0	0	0	0	
Ring-NB-Cu	0	0	0	0	0	
Ring-NB-Mg	0	0	0	0	0	
Ring-NB	0	0	0	0	0	
14. Vir-Ser-Al	74	85	94	109	0	
15. Vir-Ser-Cu	65	70	85	87	109	83,2
16. Vir-Ser-Mg	63	96	109	111	193	114,4
Ring-Ser-Al	0	0	0	0	0	
Ring-Ser-Cu	0	0	0	0	0	
Ring-Ser-Mg	0	0	0	0	0	
Ring-Ser	0	0	0	0	0	

TABELLE 26

(Fortsetzung)

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittliche Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
Vir-Ser	61	85	85	85	96	82,4
Vir-NB	61	65	70	72	85	70,6
Vir-Ring	63	74	85	91	109	84,4

Zeichenerklärung: Vir = Virus (EMC)
 NB = Normal-Bouillon
 S = Serum
 Ring = Ringer
 0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

B

ε) Bestimmung der LD 50

Zur Bestimmung der Infektionsdosis wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-8} angesetzt.

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie bei dem in Tab. 26 beschriebenen Versuch.

Verdünnungsmittel: Sterile Ringerlösung.

TABELLE 27

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10 ⁻²	+	+	+	+	+
10 ⁻³	+	+	+	+	+
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+
10 ⁻⁶	+	+	0	0	0
10 ⁻⁷	+	+	0	0	0
10 ⁻⁸	+	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging während der Beobachtungszeit ein.
0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

Berechnung der LD 50

(Auswertung der Tab. 27)

Virusver- dünnung	tot/gesamt	überlbd.	tot	tot	überlebd.	tot/gesamt	% Morta- lität
10 ⁻²	5/5	0	5	25	0	25/25	100
10 ⁻³	5/5	0	5	20	0	20/20	100
10 ⁻⁴	5/5	0	5	15	0	15/15	100
10 ⁻⁵	5/5	0	5	10	0	10/10	100
10 ⁻⁶	2/5	3	2	5	3	5/8	62,5
10 ⁻⁷	2/5	3	2	3	6	3/9	33,3
10 ⁻⁸	1/5	4	1	1	10	1/10	10
10 ⁻⁹	0/5	5	0	0	15	0/15	0

$$\begin{array}{rcl}
 \text{Abstandsfaktor:} & & 0,4288 \\
 & + & - 6,0000 \\
 \hline
 \log \text{ LD } 50 & : & - 6,4288 \\
 \text{LD } 50 & = & 0,37 \cdot 10^{-6}
 \end{array}$$

Umrechnung auf 10^{-3} (= Verdünnung der Organsuspension im Versuch)

$2703 \times \text{LD } 50 =$ die im Versuch verwandte Infektionsdosis. -

B

8) Austestung von Cu bei vergrößertem Kollektiv und verminderter Konzentration (EMC-Virus)

In Anlehnung an den Versuch A.8) Tab.22 wurde die Austestung des Cu bei verminderter Konzentration auf das $1/2$ -fache der Anfangskonzentration entsprechend einer 25%igen Sättigung wiederholt.

Ausgangsmaterial: 4 Mischhirne von Passagetieren (Tab.25).

Verdünnungsmittel: Serum

Tierkollektiv: 15 weiße Mäuse.

TABELLE 28

Austestung bei verminderter Cu-Konzentration

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
17. Vir-Ser-Cu	89	161	0	0	0	
	93	99	0	0	0	
	113	121	233	0	0	
Ring-Ser-Cu	0	0	0	0	0	
Ring-Ser	0	0	0	0	0	

TABELLE 28

(Fortsetzung)

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
Vir-Ser	90	114	126	136	146	122,4
Vir-Ring	54	66	70	90	148	85,6

Zeichenerklärung: s. Tab. 26

0 = Tiere gingen während der Beobachtungszeit nicht ein.

B

ε) Bestimmung der LD 50

Zur Feststellung der im Versuch wirklich verwandten Infektionsdosis wurde die LD 50 bestimmt; dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-8} angesetzt.

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie in Tab. 28.

Verdünnungsmittel: Sterile Ringerlösung.

TABELLE 29

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	0	0

TABELLE 29

(Fortsetzung)

Verdünnung	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10 ⁻⁶	+	0	0	0	0
10 ⁻⁷	+	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging während der Beobachtungszeit ein.
0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

Berechnung der LD 50

(Auswertung der Tab. 29)

Virus- Verdg.	tot/gesamt	überlbd.	tot	tot	überlbd.	tot/gesamt	% Morta- lität
10 ⁻²	5/5	0	5	20	0	20/20	100
10 ⁻³	5/5	0	5	15	0	15/15	100
10 ⁻⁴	5/5	0	5	10	0	10/10	100
10 ⁻⁵	3/5	2	3	5	2	5/7	71,43
10 ⁻⁶	1/5	4	1	2	6	2/8	25
10 ⁻⁷	1/5	4	1	1	10	1/11	9,09
10 ⁻⁸	0/5	5	0	0	15	0/15	0

Abstandsfaktor: : 0,4616
+ - 6,0000

log LD 50 : - 6,4616

LD 50 = 0,35 · 10⁻⁶

Umrechnung auf 10⁻³ (=benutzte Dosis im Versuch

2941 x LD 50 = im Versuch benutzte Infektionsdosis.

Aus dem Versuch Tab.28 ist zu entnehmen, daß Cu gegen EMC-Virus einen deutlichen Effekt besitzt.

C Versuche mit Influenza-Virus

α) Tierpassagen

Als Ausgangsmaterial zur Herstellung der Organvirussuspension dienten die wie oben beschriebenen aufbereiteten Lungen von 4 infizierten Tieren. Mit dem Material wurden in 1.Passage 6 und in einer 2.Passage 8 Tiere beimpft (Tab.30). -

TABELLE 30
Überlebenszeit der Passagetierte

1. Passage		2. Passage	
Tier-Nr.	Überlebenszeit in Tagen	Tier-Nr.	Überlebenszeit in Tagen
1	2	1	2
2	6	2	3
3	8	3	3
4	3	4	3
5	4	5	3
6	3	6	3
		7	5
		8	5

Als absolut tödliche Dosis wurde bei den folgenden Versuchen eine Verdünnung der Organ-Virus-Suspension von 10^{-3} benutzt. -

C

♂) Austestung von Cu (Influenza-Virus)

In Anlehnung an den Versuch A ♂) Tab.22 und B ♂) Tab.28 wurde Cu bei Verminderung der Konzentration auf die Hälfte der Anfangskonzentration entsprechend einer 25%igen Sättigung ausgetestet. -

Ausgangsmaterial: 4 Mischlungen von Passagetieren (Tab.30).

Verdünnungsmittel: Serum.

Tierkollektiv: 15 weiße Mäuse:

TABELLE 31

Austestung von Cu bei verminderter Konzentration

Verimpfte Lösungen	Überlebenszeit in Stunden					Durchschnittl. Überlebenszeit in Stunden
	1	2	3	4	5	
18. Vir-Ser-Cu	69	73	87	89	91	96,2
	87	92	97	111	115	
	73	111	111	115	122	
Ring-Ser-Cu	0	0	0	0	0	
Ring-Ser	0	0	0	0	0	
Vir-Ser	40	50	64	75	88	63,4
Vir-Ring	40	52	76	76	80	64,8

Zeichenerklärung: Vir = Virus
Ser = Serum

Ring = Ringerlösung
0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

C

ε.) Bestimmung der LD 50

Zur Bestimmung der Infektionsdosis wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-10} angesetzt.

Ausgangsmaterial: Gleiches Material wie bei dem in Tab.31 beschriebenen Versuch.

Verdünnungsmittel: Sterile Ringerlösung.

TABELLE 32

Bestimmung der LD 50

Verdünnung	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5
10^{-2}	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	0
10^{-4}	+	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+	0
10^{-7}	+	0	0	0	0
10^{-8}	0	0	0	0	0
10^{-9}	+	+	0	0	0
10^{-10}	0	0	0	0	0

Zeichenerklärung: + = Tier ging während der Beobachtungszeit ein.
0 = Tier ging während der Beobachtungszeit nicht ein.

Berechnung der LD 50

(Auswertung der Tab.32)

Virus-Verdg.	tot/gesamt	überlbd.	tot	tot	überlbd.	tot/gesamt	% Mortalität
10^{-2}	5/5	0	5	26	0	26/0	100
10^{-3}	4/5	1	4	21	1	21/22	95,5
10^{-4}	5/5	0	5	17	1	17/18	94,4
10^{-5}	5/5	0	5	12	1	12/13	92,3
10^{-6}	4/5	1	4	7	2	7/9	77,8
10^{-7}	1/5	4	1	3	6	3/9	33,3
10^{-8}	0/5	5	0	2	11	2/13	15,4
10^{-9}	2/5	3	2	2	14	2/16	12,5
10^{-10}	0/5	5	0	0	19	0/19	0

Abstandsfaktor: 0,5798

+ - 6,0000

log LD 50 : - 6,5798

LD 50 = 0,263 · 10⁻⁶

Umrechnung auf 10⁻³ (= Verdünnung der Organsuspension im Versuch)

3802 x LD 50 = die im Versuch verwandte Infektionsdosis.

Aus Tab. 31 geht hervor, daß Cu bei der angewandten Versuchsanordnung keinen viruciden Effekt auf Influenza-Viren besitzt. -

2. Ergebnisse der Virusversuche

Alle beschriebenen Versuche über eine virucide Wirkung der Testsubstanzen sind in den Tabellen 33, 34 und 35 zusammengefaßt.

Beim Vergleich der Resultate müssen die Überlebenszeiten der Kollektive von Versuchen und Kontrollen gegenübergestellt werden. Wenn bei einem Kollektiv eins oder mehrere Tiere in der Beobachtungszeit von 3 Wochen

nicht eingegangen sind, dann ist eine Mittelwertsbildung nicht möglich, da für die nicht eingegangenen Tiere eine Überlebenszeit von unendlich (∞) eingesetzt werden müßte. Deshalb wurde für jedes Kollektiv ein Mittelwert aus der Absterbegeschwindigkeit eines jeden Tieres nach Brigge errechnet. Die Absterbegeschwindigkeit ergibt sich aus der 100-fachen reziproken Absterbezeit in Stunden. Dieses ist möglich, da für die nicht eingegangenen Tiere $1/\infty = 0$ gesetzt werden kann. -

Der statistische Vergleich zwischen 2 Kollektiven erfolgte nach dem X-Test von Van der Waerden und Nievergelt. -

Übersicht über die Versuche mit Herpes-EMC-Influenza-Virus

A Herpes. Tab.33

lfd. Nr.	Tab. Nr.	Substanz	Sättigg. in %	Lösg.-mittel	Virus-susp. im Ansatz	auf LD 50 bezog.	überlbd. gesamt	A	B	C	Wirkg.
1	18	Al	50	Bouill.	10 ⁻³	4117	0/5	4,83	8,33	4,97	Ø
2	18	Cu	50	"	"	"	2/5	4,83	4,99	4,28	Ø
3	18	Mg	50	"	"	"	0/5	4,83	2,83	0,88	Ø
4	18	Al	50	Serum	"	"	2/5	5,03	2,00	1,35	+
5	13	Cu	50	"	"	"	3/5	5,03	2,31	1,50	+
6	18	Mg	50	"	"	"	0/5	5,03	2,52	0,32	Ø
7	21	Al	6,25	"	"	-	0/5	2,59	2,72	Ø	Ø
8	21	Cu	25	"	"	-	3/5	2,59	0,09	Ø	+
9	21	Mg	25	"	"	-	0/5	2,59	2,00	Ø	Ø
10	22	Cu	25	"	"	3846	13/15	3,17	0,03	Ø	++

B EMC. Tab.34

lfd. Nr.	Tab. Nr.	Substanz	Sättig. in %	Lösg.-mittel	Virus-susp. im Ansatz	auf LD 50 bezog.	überlbd. gesamt	A	B	C	Wirkg.
11	26	Al	50	Bouill.	10 ⁻³	2703	0/5	1,42	1,33	Ø	Ø
12	26	Cu	50	"	"	"	0/5	1,42	1,24	Ø	Ø
13	26	Mg	50	"	"	"	0/5	1,42	1,48	Ø	Ø
14	26	Al	50	Serum	"	"	1/5	1,23	0,89	Ø	Ø
15	26	Cu	50	"	"	"	0/5	1,23	1,23	Ø	Ø
16	26	Mg	50	"	"	"	0/5	1,23	0,98	Ø	Ø
17	28	Cu	25	"	"	2941	8/15	0,27	0,39	Ø	+

C Influenza Tab.35

18	31	Cu	25	Serum	10 ⁻³	3802	0/15	1,70	1,07	Ø	Ø
----	----	----	----	-------	------------------	------	------	------	------	---	---

Zeichenerklärung:

A = Mittlere Absterbegeschwindigkeit der Viruskontrolle.

B = Mittlere Absterbegeschwindigkeit im Versuch.

C = Mittlere Absterbegeschwindigkeit der Mittelkontrolle 100/xn.

Nach dem in Tab.33 wiedergegebenen Resultat zeigt lediglich Cu einen deutlich viruciden Effekt. Nach dem X-Test ist der Unterschied zwischen den mittleren Absterbegeschwindigkeiten von Versuch und Kontrolle mit $\Psi \left(\frac{r}{n+1} \right) = 5,64$ (Tabellenwert bei $g - h = 5$ und bei der $0,5\%$ - Schranke $= 4,85$) statistisch beweisend. -

In Tab.34 sind die Versuche mit EMC-Virus zusammengefasst. Aus der Tabelle ist zu entnehmen, daß die beste Wirkung mit Cu (laufende Nr.: 17) erreicht wurde. Der statistische Vergleich ergab jedoch für $\Psi \left(\frac{r}{n+1} \right) = 2,42$ keine statistische Signifikanz, da der Tabellenwert für die $2,5\%$ - Schranke bei $g-h = 5$ $3,78$ beträgt. Es bleibt jedoch nicht ausgeschlossen, daß bei Verwendung eines sehr viel größeren Tierkollektivs gegebenenfalls noch eine Signifikanz erreicht werden könnte. -

Jedoch könnte auch in diesem Falle nicht gesagt werden, daß alle vorhandenen Viren abgetötet werden. In Tab.35 sind die Ergebnisse mit Influenza-Virus zusammengefasst. Es ist eindeutig daraus zu entnehmen, daß Cu keinen viruciden Effekt auf dieses Virus hat. -

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Drei Substanzen, nämlich die Al - Cu - Mg - Metallverbindungen des Acetyl-Acetons wurden auf ihre antibakterielle, desodorierende und virucide Wirkung untersucht.

Folgendes wurde festgestellt:

- 1) Der Dilutionstest gegen verschiedene Keimarten nach Vorverdünnung der Wirkstoffe mit Propanol ergab im Verhältnis zur Propanolkontrolle keine Hemmung des Keimwachstums.
- 2) Qualitativ konnte ein bakteriostatischer Effekt nachgewiesen werden, wenn die Wirkstoffe in Substanz auf Ausstriche der Testkeime (feste Nährböden) aufgegeben wurden.
- 3) Eine bakteriostatische Wirkung konnte gegen die meisten Testkeime im Dilutionstest mit kalt gesättigten Lösungen der Cu - und Mg - Salze weniger und teilweise auch nicht mit dem Al-Salz festgestellt werden.

- 4) Die H_2S -Bildung wurde durch die Testsubstanzen verzögert, ist aber bei längeren Bebrütungszeiten wieder nachweisbar.
- 5) Geruchsstoffe werden durch die Testsubstanzen nicht desodoriert.
- 6) Bei Verwendung von Herpes-Encephalomyocarditis - und Influenza-Viren wurde mit dem Cu-Salz gegen Herpes-Virus ein eindeutiger virucider Effekt erzielt.
- 7) Eine geringe, bei der verwandten Kollektivgröße aber nicht statistisch beweisende Wirkung wurde mit dem Cu-Salz gegenüber dem EMC-Virus beobachtet. -

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Albrecht J. : Arch. Hyg. 141, 460-468 (1959)
- 2) Albrecht J. : Zbl. Bakt. I. Orig. 175, 333-343 (1959)
- 3) Bingel K. F. : "Die experimentelle Virusdesinfektion"
J. A. Barth-Verlag, Leipzig 1957
- 4) Gönnert R. und Bock M. : Arzneimittelforschg. 6 522-527 (1956)
- 5) Sykes G. : "Desinfection and Sterilization"
E. + F. N. Spon Ltd., London (1958)
- 6) Van der Waerden B. L. und Nievergelt E. : "Tafeln zum Vergleich zweier Stichproben mittels X-Test und Zeichentest"
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen (1956)
- 7) Van Rooyen und Rhodes: T. Nelson Sons N. Y. (1948)

Ich möchte es nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Kliewe für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes im Institut zu danken.

Weiterhin danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Dr. Gillissen für die Stellung des Themas und die vielen Ratschläge während der Versuche und für die Hilfe bei der schriftlichen Zusammenfassung der Arbeit.

Ich möchte es nicht versäumen, an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. Kliewe für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes im Institut zu danken.

Weiterhin danke ich ganz besonders Herrn Prof. Dr. Dr. Gillissen für die Stellung des Themas und die vielen Ratschläge während der Versuche und für die Hilfe bei der schriftlichen Zusammenfassung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Am 12. Juni 1931 wurde ich, Peter Gerd Fix, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Walter Fix und seiner Ehefrau Ellen, geb. Schulte, in Dortmund geboren. Ostern 1938 wurde ich in die Volksschule in Bünde/Westf. und Ostern 1942 in das Neusprachliche Gymnasium Bünde aufgenommen. Im Frühjahr 1952 wechselte ich auf das Landschulheim Steinmühle bei Marburg über, wo ich am 25. März 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im Mai 1953 begann ich das Studium der Medizin in Würzburg, ließ mich im November 1956 in Mainz immatrikulieren, wo ich am 25. April 1958 die Ärztliche Vorprüfung bestand. Die klinischen Semester studierte ich in Mainz mit Ausnahme des zweiten Semesters, das ich in Innsbruck verbrachte. Zur Zeit befinde ich mich im vierten klinischen Semester und beabsichtige, im Sommer 1961 das Medizinische Staatsexamen abzulegen. -

